

無題

1/7/2  
DIALOG(R)File 350:Derwent WPIX  
(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

014441868 \*\*Image available\*\*  
WPI Acc No: 2002-262571/200231

Solid-phase for use in immune tests, comprises biologically active substance directly coupled on surface of solid-phase having one part chemically activated and another part incoherent with biological active substance

Patent Assignee: OLYMPUS OPTICAL CO LTD (OLYU )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2001330614	A	20011130	JP 2000153344	A	20000524	200231 B

Priority Applications. (No Type Date): JP 2000153344.A 20000524

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2001330614	A		7	G01N-033/543	

Abstract (Basic): JP 2001330614-A

NOVELTY - A solid-phase comprises a biologically active substance directly coupled on the surface of the solid-phase. The solid-phase surface has at least one part which is chemically activated and other part which is incoherent with the biological active substance.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for manufacture of solid-phase, which involves chemically activating at least a part of the solid-phase surface, and providing a biologically active substance on the chemically activated solid surface which has an incoherent part.

USE - For use in immune tests, such as blood test for determining blood group and blood platelet compatibility.

ADVANTAGE - The solid-phase directly coupled with biologically active substance has high stability and can be effectively preserved under freeze-dried conditions. The solid-phase enables testing with high accuracy in short period of time.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows the test of intersection compatibility of blood platelets using the solid-phase. (Drawing includes non-English language text).

pp: 7 DwgNo 1/1

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/543

International Patent Class (Additional): C07K-001/08; C07K-017/02;

G01N-033/553

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-330614

(P 2 0 0 1 - 3 3 0 6 1 4 A)

(43) 公開日 平成13年11月30日 (2001. 11. 30)

(51) Int. Cl.

G01N 33/543

識別記号

581

F I

G01N 33/543

テームコード (参考)

581 W 4H045

581 F

581 G

581 U

525 G

525

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2000-153344 (P 2000-153344)

(22) 出願日

平成12年 5 月 24 日 (2000. 5. 24)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 43 番 2 号

(72) 発明者 佐藤 和久

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 43 番 2 号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外 4 名)

F ターム (参考) 4H045 AA20 BA61 EA50 FA44 FA81

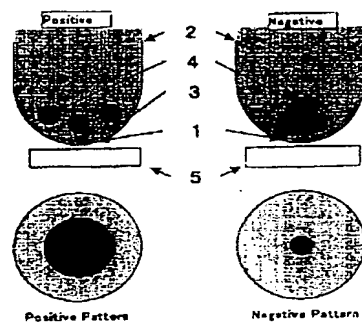
(54) 【発明の名称】 生物活性を付与した固相およびその製造方法

(57) 【要約】

(修正有)

【課題】 抗体等の生物活性が付与された固相であって、短時間で精度の高い免疫検査を達成することが可能な固相を提供することを目的とする。

【解決手段】 抗体等の生物活性物質が表面に直接結合された固相であって、上記固相の表面の少なくとも一部に化学的に活性化可能な部分を配置するとともに、他の部分が上記生物活性物質に対して非干渉性であるような特性を有し、更に上記固相が液体中で懸濁性と沈降性を有するとともに、磁性体を適宜含有してなる固相を製造する。



【符号の説明】

- 1 - 血小板;
- 2 - 容器;
- 3 - 抗血小板抗体;
- 4 - 磁性担体;
- 5 - 磁石

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生物活性物質が表面に直接的に結合された固相において、該固相の表面の少なくとも一部が化学的に活性化されているとともに、他の部分が前記生物活性物質に対して非干渉性であることを特徴とする固相。

【請求項 2】 前記固相が液体中での懸濁性と沈降性を有する担体で、且つ磁性体を適宜含有してなることを特徴とする請求項 1 に記載の固相。

【請求項 3】 少なくとも表面の一部に化学的に活性化可能な部分を配置するとともに、前記生物活性物質に対して非干渉性であるような特性を有する固相を化学的に活性化する工程と、

活性化された前記固相の表面に生物活性物質を接触させる工程とを有する生物活性を付与した固相の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、生物活性物質が結合された固相に関する。より具体的には、本発明は、例えば、抗体等の免疫学的物質が直接結合された免疫検査用担体に有効に適用できる。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、生物活性の有無又は強度を指標として、生物活性物質を分析したり、抽出等するための固相を利用する技術は、広く使用されている。

【0003】 例えば、抗体を用いた免疫検査は、血液型の決定や血小板の交差適合性試験等の各種血液検査において広く使用されている。安全に輸血を実施する上で、これらの血液検査は不可欠であり、医療事故を防ぐために、検査の精度はできる限り高くなければならず、且つ迅速に検査を行い得ることが必須である。また、検査に使用する試薬も長期にわたり安定して保存し得ることが必要である。

【0004】 現在、血液検査、例えば、血小板の交差適合性試験等を実施するためには、標識可能なラベルで標識された抗IgG抗体を結合した赤血球（抗体感作赤血球）を用いた操作が一般的に使用されている。

【0005】 該操作では、まず、血小板等の血液細胞を固相したプレートに血小板抗原に対する抗体を含む試料を添加する。続いて、抗体感作赤血球を加えて、血小板抗原に対する前記抗体に結合させる。血小板抗原に対する抗体が血小板抗原に結合しているか否かによって、抗体感作赤血球の凝集パターンが異なるので、該パターンに基づいて、試料中の抗体の種類を決定することができる。

【0006】 しかしながら、該操作において、赤血球の凝集パターンは、抗体感作赤血球の自然沈降によって形成させるので、結果が得られるまでに4〜16時間も必要であり、急を要する場合に使用することができない。

【0007】 操作時間を短縮するためには、赤血球以外の担体に各種の生物活性物質を結合させることが有用で

あるが、一般的に、担体に各種の抗体の生物活性物質を結合させる技術は、担体の材質に応じて、吸着法や共有結合法がある。

【0008】 吸着法は、担体自身の表面の荷電性や表面の疎水性や水素結合による方法がある。吸着法の場合、タンパク等を吸着する力が強すぎると非特異反応を招きやすく、また、pH等の反応環境が異なると反応量も変化することもあるので、生物活性の反応精度が低かったり、長期保存が困難な場合が多い。

【0009】 また、共有結合法は、担体表面上に、スパーサーとして機能するような活性化剤や架橋剤を化学的に継ぎ足すことによってタンパク質等を結合させるものであるが、継ぎ足しの数量を増して結合量を高めようとするとその分非特異結合の機会も増える傾向がある。そのため、目的のタンパク等が結合した以外の部分を生物活性に対して不活性な有機物（例えば、アルブミン）で覆うように保護処理することが多い。故に、共有結合法は、吸着法と同様に、非特異反応が発生して反応精度が低かったり、保護用の有機物の変性又は継ぎ足しによる立体構造の安定性低下によって長期保存が困難な傾向にある。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、生物活性物質が表面に直接的に結合された固相であって、短時間で精度の高い免疫検査を達成することが可能な固相を提供することを目的とする。

## 【0011】

【課題を解決するための手段】 前記課題を解決するために、本発明は、生物活性物質が表面に直接的に結合された固相において、該固相の表面の少なくとも一部が化学的に活性化されているとともに、他の部分が前記生物活性物質に対して非干渉性であることを特徴とする固相を提供する。

## 【0012】

【発明の実施の形態】 本発明は、生物活性物質が表面に直接的に結合された固相を提供する。

【0013】 本発明の固相は、典型的には、「免疫検査」、すなわち抗体を使用する任意の検査、分析、及び試験に使用し得る。

【0014】 本明細書において「固相」とは、粒子、基板、棒などの外壁表面や容器、管、カラム、多孔質部材などの内壁表面が少なくとも不溶性で且つ不動化された状態である物をいう。また、「生物活性物質」とは、抗原、抗体、核酸、酵素、ホルモン、細胞等の免疫学的、生化学的、ないし遺伝学的活性を有するものをいう。

【0015】 固相に、生物活性物質が「直接的に結合」しているとは、固相中の基と生物活性物質中の基が直接的に結合を形成していることを意味する。すなわち、本発明の固相は、架橋剤や色素を介して、生物活性物質が固相に結合されていない。

【0016】生物活性物質を直接的に結合するために、本発明の固相は、少なくとも表面の一部が化学的に活性化されている。ここで、「化学的に活性化されている」とは、後述する実施の形態に記載の群から選ばれる官能基を有する材料が、後述する実施の形態に記載の化学的な活性化処理によって、生物活性物質を結合可能な状態に変化されていることを意味する。

【0017】好ましくは、活性化可能な材質を有する固相は、固定すべき生物活性物質に対して無干渉である、又は殆ど無干渉であるような生体に近い物質である。例えば、生物活性が抗原抗体反応性であれば、活性化可能な材質は、抗原性がないもの、又は殆どないものをいう。

【0018】従って、本発明の固相は、活性化された部分を除いて、生物活性物質に対して非干渉性である。

「生物活性物質に対して非干渉性である」とは、電荷、粘着等による物理的吸着力、生物活性への親和力、生物活性への排斥力が表面に現れないか、あるいは無視できる程度であることをいう。例えば、生物活性が抗原抗体反応性である場合には、固相が抗原性を持たないか、あるいは殆どないに等しい場合をいう。

【0019】本発明の固相を調製するには、固相中の基と生物活性物質中の基を化学的に結合させる操作を行う。

【0020】生物活性物質を結合させるべき固相としての担体には、例えば、ゼラチン、天然ゴム、ポリアミノ酸、コラーゲン、アラビアゴム、デキストラン、セルロース、アガロース等の多糖、親水性のポリビニル、ポリエチレングリコール、アクリルアミド、及びそれらの混合物を使用することができる。これらの材料を固相状態にするためには公知の造粒技術を適用して、0.5~30 $\mu$ mの微粒子を得るようにすればよい。また、表面がこれらの材料で被覆された非干渉性材料からなる固相を使用してもよい。

【0021】例えば担体は、粒子、マイクロタイタープレート、マイクロチューブを含む任意の形態であり得る。

【0022】ここで、発明者の検討によれば、水酸基を充分に利用できる点と、粒子同士の分散性及び検査又は抽出対象物に対する粒子表面の非干渉性に優れるという点で、ゼラチンとアラビアゴムのコアセルベート粒子(特公平7-86508参照)が最適な材料の組み合わせによる固相の一態様であることが分かった。特に、後述する実施例でも示されているように、本発明を適用した上記コアセルベート粒子により、生物活性の保存安定性や反応性が極めてデリケートである血小板の膜抗原に対して、信頼性の高い性能が得られたことは、本発明で初めて報告できたものであり、今後の輸血検査に大いに貢献できる技術であると期待される。

【0023】以下で詳述されているように、固相中の基

には、生物活性物質中に存在する基、例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、イミダゾール基、グアニジル基、又はスルフヒドリル基等が結合される。それ故、固相は、これに結合すべき生物活性物質中に存在するこれらの基と反応して結合を形成し得る基を含有していなければならない。例えば、固相は、遊離の水酸基、アミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基、又はスルフヒドリル基等を含んでいることが好ましい。

【0024】生物活性物質が、タンパク質の場合には、高次構造が保持され得る温和な条件下で固相に結合させなければならない。このような条件下で、固相にタンパク質を固相化する方法自体は公知である。

【0025】固相が、アミノ基又は水酸基を有しているときには、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)やジシクロヘキシルカルボジイミド(DDC)を使用して、固相のアミノ基又は水酸基に生物活性物質のカルボキシル基を結合させることができる。反対に、固相が、カルボキシル基を有しているときには、同様の方法で、生物活性物質のアミノ基を固相のカルボキシル基に結合させることも可能である。

【0026】また、固相が、カルボキシル基を有しているときには、ペプチドの固相合成と同様の方法を適用してもよい。より具体的には、固相に活性化剤を結合させて活性化された固相を生成させた後に、生物活性物質を接触させれば、固相のカルボキシル基と生物活性物質のアミノ基を結合させることが可能となる。

【0027】ここで、「活性化剤」とは、固相のカルボキシル基に結合して、ペプチドのアミノ基が結合し得るように固相のカルボキシル基を活性化させ得る物質をいい、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、及び3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジンを含むN-ヒドロキシ化合物、好ましくはN-ヒドロキシスクシンイミドを使用し得る。

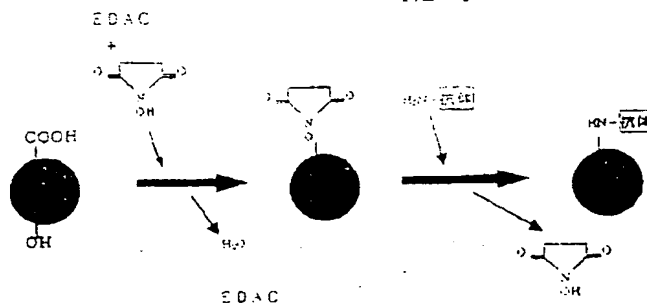
【0028】活性化剤を用いて固相のカルボキシル基を活性化させるときには、脱水剤を添加して、活性化された固相が生成する反応を促進させるのが好ましい。

【0029】脱水剤としては、カルボジイミド、又はその誘導体、若しくはその塩、より好ましくは、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DDC)、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EADC)、又はジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)を使用し得る。

【0030】このように、本発明の固相は、少なくとも表面に化学的に活性化可能な部分を配置するとともに前記生物活性物質に対して非干渉性であるような特性を有する固相を化学的に活性化する工程と、活性化された前記固相の表面に生物活性物質を接触させる工程によって製造することができる。このような固相の製造方法も本発明の範囲に属する。

【0031】一例として、N-ヒドロキシ化合物を用い

て、固相に生物活性物質を直接結合させる操作を下式に示す。



【0033】EADCとN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて固相に抗体を結合させる場合、pHは3~10であり得るが、活性化剤による活性化部分を縮合させる縮合剤(この場合、ヒドロキシ化合物の水酸基を脱水化させる脱水剤)の影響により、中性付近(例えば、pH5.7~6.6の範囲内)での温和な条件下で且つ塩酸を含まないリン酸(又は炭酸)のみによる調製が可能となり、廃棄物としての扱いも簡単であるという利点がある。pH5.7~8.0、最も好ましくはpH6.2付近で反応させると抗体が固相に結合しやすくなる。また、この場合、リン酸緩衝液又は炭酸緩衝液、より好ましくは、リン酸緩衝液中で反応させると、抗体が固相に結合しやすい。

【0034】固相に結合させるべき抗体に代えて、又は抗体とともに抗体断片、例えばFab断片を結合させてもよい。抗体又はその断片は、任意の抗原であり得るが、ヒト、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコなどの各免疫グロブリンクラスに対する抗体が好適である。

【0035】生物活性を付与した固相には、好ましくは、磁性体を含有させ得る。前記固相が、封入、付着、被覆等により磁性体を含有せしめた担体である場合、液体中での攪拌、洗浄、測定等の各処理過程で適宜の磁気発生手段(永久磁石、電磁石等)によって所望の処理工程を短時間で行うことができる。

【0036】生物活性物質が直接的に結合された本発明の固相は、架橋剤を介して生物活性物質を結合した固相に比べて安定性が高い。従って、架橋剤を介して生物活性物質を結合した固相は、液中では長期の保存中に架橋剤に起因する非特異的な反応の程度変化や結合が切断する等して特異的な反応性が変化することがあるので、凍結乾燥した状態で保存しなければならないのに対して、本発明の担体は、広範囲な保存条件に対しても、長期にわたった影響を受けにくく、0~10℃の低温、より好ましくは0~4℃の低温下で、担体に結合した抗体等の生物活性を長期にわたって安定に保存できることが分かった。とりわけ、抗体が直接的に結合された本発明の固相は、従来の同種の固相に比べて安定性が高い。

【0037】また、本発明の固相は、検出用の色素を介して生物活性物質が結合された従来の固相に比べて、非特異的反応が起こりにくい。従って、本発明の固相は、

【0032】

【化1】

血液検査等の特に高い精度を要する検査に使用するのに適している。

【0038】本発明の固相は、前述のごとく、抗体を用いた任意の検査に使用し得る。

【0039】典型的には、「抗体を用いた検査」は、臨床医学、基礎科学、又は個体識別の分野でなされる検査、好ましくは臨床検査であり得る。

【0040】好適な臨床検査は、交差適合性試験(血液交差適合試験)、血小板、赤血球、リンパ球、単球、顆粒球等の細胞抗原に対する抗体のスクリーニングや抗体同定試験等の血液検査である。とりわけ、抗ヒトIgG結合ヒツジ赤血球の代わりに本発明の固相を使用すると、血小板の交差適合性試験の検査時間が著しく短縮されるので、本発明の固相は、血小板の交差適合性試験に適用するのに極めて適している。その他、本発明の固相は、ウイルス、バクテリア等の病原体の抗原に対する抗体スクリーニングや抗体同定試験、交差適合性試験、及び抗原型検査にも適用し得る。

【0041】また、本発明の固相は、その他、免疫組織化学、ウェスタンブロッティングなどの分析法にも適用できる。

【0042】例えば、本発明の固相を用いる血小板の交差適合性試験は、典型的には、図1に示す操作によってなし得る。

【0043】該操作を実施するには、まず、U字状底部に血小板1が固相又は固定された容器2を準備する。容器2には、特許第2532670号に記載されている方法により、小麦胚芽レクチン(WGA)を用いて血小板1を固相するのが好ましい。あるいは、グルタルアルデヒドやホルムアルデヒドを用いて、血小板1を固定してもよい。

【0044】血小板1に対する抗体、すなわち抗血小板抗体3を含有する試料、通常は、血小板の抗原型を決定すべき患者の血清を容器2に分注する。前記試料には、低イオン強度緩衝液(low ionic strength solution)等を加えれば、37℃、30分で反応を終了させることができる。

【0045】続いて、B-F分離を行って、結合しなかった抗血小板抗体3を除去する。

【0046】容器2に、抗IgG抗体が直接結合された磁

性担体4を分注した後、容器2を磁石5の上に載置し、磁性担体4を容器2のU字状底部に接触させる。

【0047】約2分後に、磁性担体4の分布状態をみることにより、血小板抗原の型を知ることができる。

【0048】例えば、供血者の血小板がHPA-1<sup>a</sup>抗原を持ち、患者血清中に抗HPA-1<sup>a</sup>抗体が存在しているとする、容器2のU字状底部に存在する血小板1の表面に存在するHPA-1<sup>a</sup>抗原に抗HPA-1<sup>a</sup>生物活性物質が結合する。従って、その後、磁性担体4に直接結合された抗IgG抗体が、血小板1の表面に結合した抗HPA-1<sup>a</sup>抗体に結合し得る。

【0049】その後、容器2に磁石5を近づければ、磁性担体4は、抗HPA-1<sup>a</sup>抗体を介して血小板1に結合していないのでU字状底部の中央に集まる（図1の陰性パターン）。これに対して、磁性担体4は、抗HPA-1<sup>a</sup>抗体を介して血小板1に結合しているため磁石5を近づけてもU字状底部の中央に移動しない（図1の陽性パターン）。

【0050】以上のように、本発明の固相を用いれば、血小板の交差適合試験を簡便且つ正確に行うことが可能となる。それ故、上記操作等を用いて血小板の抗原を決定する方法も本発明の範囲に属する。

【0051】さらに、その他の血液検査も同様の操作で実施し得るので、血小板抗原に対する抗体を決定し、又は該抗体の有無を検出するための血小板抗体スクリーニング試験、赤血球抗原、又は白血球抗原の型を決定するための方法その他の血液検査法も本発明の範囲に属する。

【0052】以下、実施例によって、本発明をさらに詳細に説明する。

【0053】〔実施例1〕本実施例では、血小板交差適合性試験に使用し得る抗体感作磁性粒子の製造法について説明する。なお、本実施例を含む以下の実施例では、磁性粒子を除いて、市販の抗血小板抗体検査試薬OLYB10<sup>TM</sup>（オリンパス光学工業社製）中のキットの各種試薬およびレクチン固相化容器を用いた。

【0054】まず、特公平7-86508号に記載の造粒方法を用いて適量の磁性体を混合させた約7.5 $\mu$ mの磁性ゼラチン粒子（オリンパス光学工業（株）製）を純水で3回洗浄し、約19%磁性ゼラチン粒子に調整した。

【0055】N-ヒドロキシスクシンイミド0.1g、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)-カルボキシイミド（EDAC）0.1gを順に加え、時々攪拌させながら室温で0.5時間反応させた。

【0056】3回純水で洗浄した後、200 $\mu$ g/mLのウサギ由来抗ヒトIgG-リン酸緩衝液（pH6.2）を10mL添加し、攪

拌させながら37℃で1時間反応させた。

【0057】PBS（pH7.2、4℃）30mLで3回洗浄後、0.05w/v% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PBS（pH7.2）（4℃）30mLに浮遊し、4℃で一晩（18時間）反応させた。

【0058】遠心して、抗体感作された磁性ゼラチン粒子を約0.5%磁性ゼラチン粒子濃度になるように、0.05w/v% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PBS（pH7.2）中に浮遊した。

【0059】このように調製された磁性ゼラチン粒子溶液は、以下の実施例において4℃で6ヶ月以上安定に保存でき、しかも反応性が低下しないということが確認できた。

【0060】なお、上述した実施例において、カルボジイミドとヒドロキシスクシンイミドとは、どちらか一方のみで表面処理した場合には十分な反応感度は得られず、両方を用いるのが好ましかった。特にヒドロキシスクシンイミドを担体表面に接触させた状態でカルボジイミドが作用するように、例えば、ヒドロキシスクシンイミド溶液を担体に供給した後にカルボジイミドを添加するような順で処理した方が、さらに感度が向上する傾向があった。

【0061】〔実施例2〕本実施例では、実施例1で調製した抗体感作磁性粒子を用いた血小板交差適合性試験について説明する。

【0062】まず、血小板製剤のセグメントから得られた約1mLの血小板浮遊液に15vol%に相当する約150 $\mu$ LのA CD-A液を加えて攪拌した後、これを遠心分離して上清（血漿）を除去し、血小板細胞数が3万/ $\mu$ Lになるように、10mM EDTA-PBS（pH6.0）に浮遊させた。

【0063】特開平2-124464に記載のWGA（小麦胚芽レクチン）を固相化したWGA固相プレート（オリンパス光学工業（株）製）に、調整済み血小板浮遊液を50 $\mu$ L/ウェル分注した。遠心、未固相の血小板を洗浄分離した。

【0064】患者の血清（各抗HPA-1a抗体、抗HPA-3a抗体、抗HPA-4a抗体、抗HPA-5a抗体含有）を低イオン強度緩衝液（LISS液）と混合し、血小板が固相されたプレートに100 $\mu$ L/ウェル分注した。

【0065】37℃で、30分インキュベートした後、未反応の抗体を洗浄分離した。

【0066】実施例1で作成した約0.5%磁性ゼラチン粒子浮遊液を25 $\mu$ L/ウェル分注した。

【0067】プレートを磁石上に2分間放置し、生じたウェル内分布パターンを確認した。

【0068】結果を表1に示す。

【0069】

【表1】

血小板製剤中の血小板		患者血清			
No		HPA-1a	HPA-3a	HPA-4a	HPA-5a
1	HPA-1a, 4a, 5a	×400	(-)	×1600	×80
2	HPA-1a, 3a, 4a, 5a	×800	×320	×1600	×80
3	HPA-1a, 3a, 4a, 5a	×400	×320	×1600	×80
4	HPA-1a, 4a, 5a	×400	(-)	×1600	×40
5	HPA-1a, 3a, 4a, 5a	×800	(-)	×1600	×160
6	HPA-1a, 3a, 4a, 5a	×800	×320	×1600	×160

【0070】表中、(-)は、陰性パターン(未反応)であり、陽性パターンは、陽性を示す患者血清の希釈倍率(×400、×800)で表した。

【0071】表1から明らかなように、HPA-3a抗原を欠く血小板には、抗HPA-3a生物活性物質が結合しなかった。一方、HPA-1a抗原及びHPA-4a抗原を有する血小板には、少なくとも400倍の希釈倍率の抗HPA-1a抗体及び抗HPA-4a生物活性物質が結合した。

【0072】以上より、実施例1で調製した磁性ゼラチン粒子が非特異的な吸着を示さず、該粒子を用いれば、良好な試験結果が得られることが明らかとなった。

【0073】[実施例3] 本実施例では、実施例1で調製した抗体感作磁性粒子を用いた血小板抗体スクリーニング試験について説明する。

【0074】Anti-PLT・オリビオ・MPH11<sup>TM</sup> (オリンパス光学工業(株)製)のキット中の陽性コントロール血清及び陰性コントロール血清を希釈した。

【0075】続いて、上記キット中の洗浄液を加えた洗

浄容器の中に、ウェル内が完全に浸るように、血小板抗原プレートを5分間浸した後、5回洗浄した。5分間浸した後、5回洗浄した。洗浄した抗原プレートをペーパータオル等の上ではたいて、洗浄液をよく切った。

【0076】希釈した前記血清を25 $\mu$ L/ウェル分注し、前記抗原プレートを常温湿潤状態で2時間静置した。

【0077】反応後、検体を捨て、上記洗浄液で、抗原プレートを4回洗浄し、さらに洗浄液を交換して、抗原プレートを1回洗浄した後、洗浄した抗原プレートをペーパータオル等の上ではたいて、洗浄液をよく切った。

【0078】実施例1で調製した約0.5%磁性ゼラチン粒子浮遊液を25 $\mu$ L/ウェル分注した。

【0079】抗原プレートを磁石上に3分間静置し、生じたウェル内分布パターンを確認した。結果を表2に示す。

【0080】

【表2】

血清		抗体 PLT・オリビオ・MPH11 の抗原プレート
血清の種類	希釈倍率	
陰性コントロール血清	16 倍	-
陽性コントロール血清	32 倍	+++
	64 倍	+++
	128 倍	++
	256 倍	+
	512 倍	-

【0081】表2では、陰性パターン(未反応)は、「-」で、陽性パターンは、「+」(やや弱い)、「++」(強い)、「+++」(とても強い)で表わされている。

【0082】表2から明らかなように、陰性コントロール血清を用いると、希釈倍率16倍でも反応しなかったのに対して、陽性コントロール血清を用いると、希釈倍率256倍まで反応を示した。

【0083】以上より、実施例1で調製した抗体感作磁性粒子を用いれば、血小板抗体スクリーニング試験を精

度よく行い得ることが明らかとなった。

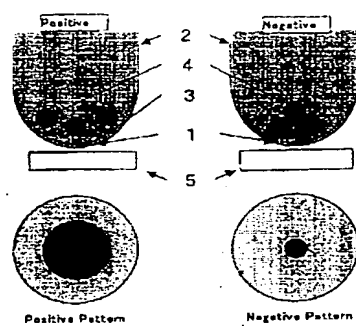
【0084】

【発明の効果】本発明の固相によれば、短時間で精度の高い免疫検査を達成することができる。さらに、本発明の固相は、液体中で安定に保存することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の固相を用いた血小板の交差適合性試験を示す図。

【図 1】



## 【符号の説明】

- 1 - 血小板；
- 2 - 容器；
- 3 - 抗血小板抗体；
- 4 - 磁性担体；
- 5 - 磁石

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

G 0 1 N 33/543

識別記号

5 2 5

F I

G 0 1 N 33/543

テマコード (参考)

5 2 5 U

5 2 5 W

5 4 1 A

C 0 7 K 1/08

17/02

G 0 1 N 33/553

5 4 1

C 0 7 K 1/08

17/02

G 0 1 N 33/553